

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

Chefärztin: Professor Dr. med. J. Boll

**DIE EINWIRKUNG VON PREDNISOLONACETAT
UND FLUCORTOLONHEMISULFAT AUF DIE
PROLIFERATION VON KNOCHENMARKZELLEN
BEI AKUTER
MYELOISCHER LEUKÄMIE IN VITRO**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gernot Lüllwitz

aus Pyritz

1978

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

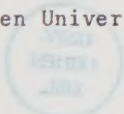
(Chefärztin: Professor Dr. med. J. Boll)

DIE EINWIRKUNG VON PREDNISOLONACETAT UND FLUOCORTOLON-
HEMISULFAT AUF DIE PROLIFERATION VON KNOCHENMARKZELLEN
BEI AKUTER MYELOISCHER LEUKÄMIE IN VITRO

Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Gernot Lüllwitz
aus Pyritz

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

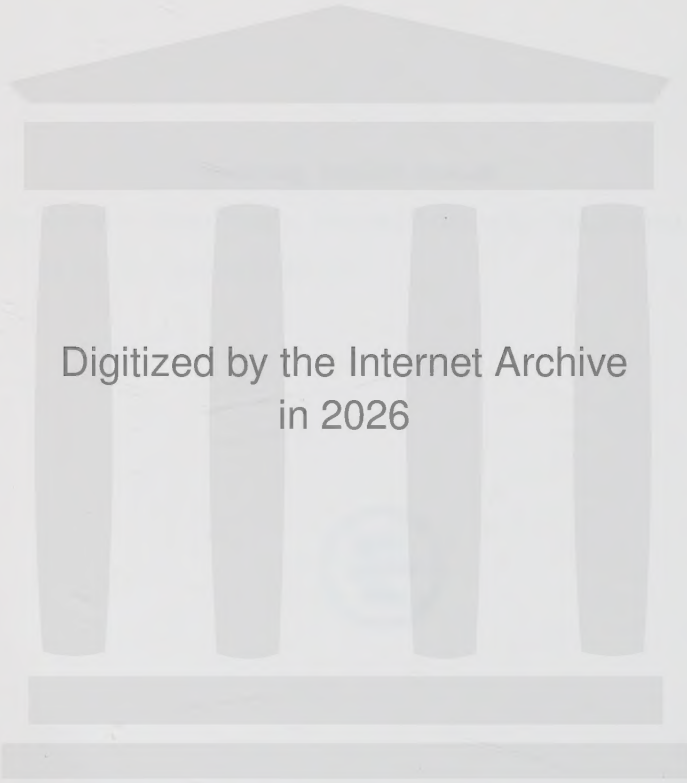
Korreferent: Prof. Dr. med. Hansjörg Riehm

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 3.3.78

Meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

G l i e d e r u n g

	<u>Seite</u>
I. Einführung mit Fragestellung	7
II. Material und Methode	12
III. Ergebnisse mit statistischer Auswertung	20
IV. Diskussion	61
V. Zusammenfassung	65
VI. Literaturverzeichnis	66

I. Einführung mit Fragestellung

Die akute Leukämie ist eine maligne, irreversible, innerhalb kurzer Zeit tödlich verlaufende Erkrankung der Leukozyten und ihrer Vorstufen unbekannter Ätiologie. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten unreifer, abnormer Zellen im Knochenmark und/oder im peripheren Blut, durch fortschreitende Anämie sowie durch Thrombopenie .

Nach der Erstbeschreibung einer Leukämie als klinische Krankheitseinheit von V i r c h o w 1845 wurde erstmals von F r i e d l ä n d e r 1857 der akute Verlauf einer Leukämie mitgeteilt.

Als Ursache für die gesteigerte Vermehrung pathologischer Zellen wurde eine erhöhte Produktionsrate angesehen, welche ihrerseits durch eine verkürzte Generationszeit erklärt wurde. Erst in letzter Zeit wurde diese Annahme mit zytokinetischen Methoden überprüft. Dabei zeigte sich bei der Mehrzahl der Leukämien

1. keine verkürzte, sondern eine normale oder verlängerte Generationszeit der Blasten (2,6,7,12,18,20,38,53),
2. eine normale oder verminderte Produktionsrate (2,6,7,14,18,19,27,39,53,55),
3. eine deutliche Verlängerung der Aufenthaltszeit der Blasten im Blut.

B o l l (6) fand bei 54 Knochenmarkausstrichen unbehandelter Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie einen mittleren Mitoseindex von 12 % . Gegenüber dem Mitoseindex normaler Myeloblasten von 45 % (7,38) ist er hochsignifikant erniedrigt. Die DNS-Synthesezeit bei der akuten Myeloblastenleukämie beträgt mit verschiedenen Methoden gemessen konstant 20 Stunden (6) und ist gegenüber dem Wert bei der normalen Granulozytopoese von 14 Stunden (7) ähnlich wie die Mitosedauer von 2,3 gegenüber 1,3 Stunden bzw. 77 gegenüber 45 Minuten (7,8,50,51) verlängert.

Trotz des erniedrigten Mitoseindex, der verlängerten DNS-Synthesezeit und der verlängerten Mitosedauer kommt es bei der akuten Myeloblastenleukämie infolge eines Reifungsblocks zwischen Myeloblasten und Promyelozyten zu einer Überflutung des Knochenmarkes mit Blasten.

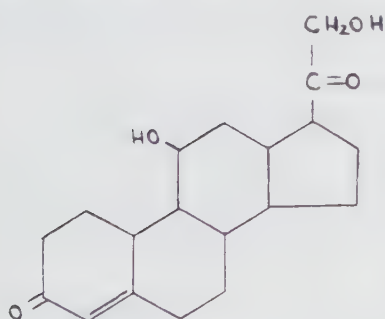
Die Zytostatika-Ära brachte für die Behandlung der Leukämien entscheidende Fortschritte. Von Bedeutung war die Einführung von Folsäureantagonisten in die Therapie der akuten Leukämie durch F a b e r 1949.

W i n t r o b e (62) und seine Schule machten 1951 erstmals auf den Wert der Steroide aufmerksam. Die Nebenwirkungen der hochdosierten Steroidtherapie, wie Natrium- und Wasserretention, Diabetes, Hypertonie, Eiweißverlust und psychische Störungen waren zunächst noch sehr schwerwiegend. Erst als 1955 durch Dehydratation von Cortison und Hydrocortison Prednison und Prednisolon entstanden, wurden Corticosteroide mit geringeren Nebenwirkungen mit etwa vier bis fünfmal stärkerer therapeutischer Wirkung als Cortison geschaffen.

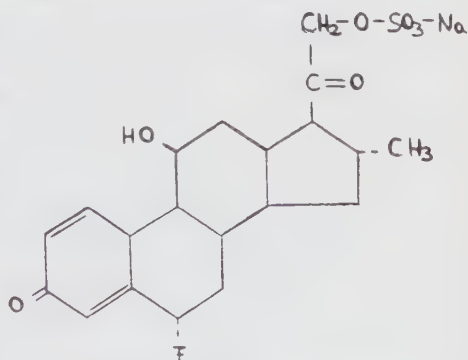
Die vorzugsweise bei der akuten Lymphoblastenleukämie mit Erfolg eingesetzten Corticosteroide greifen in den DNS- und RNS-Stoffwechsel lymphatischer Zellen ein (61) und reduzieren ihr Wachstum. Ihr Wirkungsmechanismus bei der Therapie myeloischer Leukämien ist bisher noch nicht eindeutig geklärt; neue Arbeiten berichten jedoch auch von Corticoid-Rezeptoren an Myeloblasten bei der akuten myeloischen Leukämie (41). Untersuchungen von W i l m a n n s (61) ergaben bei einer Patientin mit akuter Lymphoblastenleukämie unter hochdosierter Prednisolonbehandlung einen steilen Abfall der Thymidinkinase in den Lymphoblasten des peripheren Blutes und des Knochenmarkes. Diesen Steroideffekt konnte Wilmanns allerdings nur bei lymphoiden und einigen monozytoiden Formen der akuten Leukämie verifizieren, nicht aber für die akuten myeloischen Leukämien.

Durch die Einführung von Halogen-Atomen, von Methylgruppen, Reduktion mit Bildung neuer Doppelbindungen können die Wirkungen der Steroide quantitativ verändert werden. Es entstehen

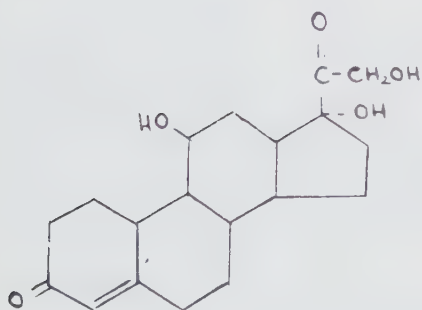
Verbindungen, in denen erwünschte therapeutische Eigenschaften stärker ausgeprägt, unerwünschte abgeschwächt oder aufgehoben sind. Auf diese Weise entstand auch das Fluocortolon, zu dem man, ausgehend vom Corticosteron, gelangt, durch Einführung eines Fluoratoms in 6- α -Stellung, einer CH_3 -Gruppe in 16- α -Stellung und einer weiteren Doppelbindung im Ring A. Die Einführung von Fluor in 6- α -Stellung des Steroidmoleküls bewirkt eine Verstärkung der entzündungshemmenden Wirkung und der Glucocorticoidaktivität. In unseren Versuchen verwendeten wir den gut wasserlöslichen Ester Fluocortolonhemisulfat.



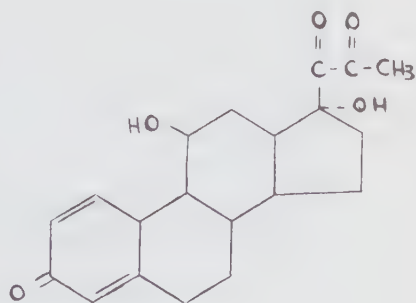
Corticosteron



Fluocortolonhemisulfat



Hydrocortison



Prednisolonacetat

Der Effekt der Corticoide auf normale Knochenmarkzellen in vitro wurde bereits mehrfach untersucht; dabei wurden unterschiedliche Ergebnisse mitgeteilt: Nach Einwirkung von jeweils $0,25 \mu\text{g/ml}$ Prednisolonacetat bzw. Triamcinolon auf Knochenmarkkulturen in vitro fanden Weissenfels und Boll (59) sowie B. und U. Christoph (16,17) eine Proliferationshemmung sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese.

Bei Versuchen mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ Fluocortolon am menschlichen Knochenmark berichtet Koch (40) übereinstimmend mit Weissenfels und Boll von einer herabgesetzten Regeneration der Erythropoese und von einer Reifungshemmung in beiden Reihen. In der Granulopoese trat dagegen eine signifikante Regenerationsförderung ein.

Schellack und Wilde beobachteten bei in vitro-Untersuchungen am menschlichen Knochenmark mit $0,25 \mu\text{g/ml}$ Dexamethasonhemisulfat bzw. Prednisolonsulfat eine Proliferationsförderung sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese (54,60).

Die Einwirkung der weit höheren Dosis von 250 mg/ml Prednisolon auf menschliche Knochenmarkkulturen ergab bei Boll und Mitarbeitern eine Proliferationsförderung in der Granulopoese, die auch Morrison und Töpfer (44) in ihren in vitro-Untersuchungen mit Ratten fanden.

In vitro-Versuche von Heines (34), der Fluocortolonhemisulfat in einer Konzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$ auf gesundes menschliches Knochenmark einwirken ließ, ergaben in der Granulopoese eine nur geringfügige Reifungshemmung nach 24 und 72 Stunden Kulturdauer und eine Regenerationsförderung, die sich in einer erhöhten Mitosezahl bei unveränderten karyologischen Kurven ausdrückte.

Fragestellung

Diese Arbeit untersucht die Wirkung von Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat auf die Proliferation menschlicher leukämischer Knochenmarkzellen. Es interessierte, ob unter den gleichen Versuchsbedingungen der von W e i s s e n - f e l s (59) und von H e i n e s (34) beschriebene Effekt auch an leukämischen Knochenmarkzellen vom Menschen auftrat. Insbesondere sollte durch vergleichende Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, ob die Wirkung von Fluocortolonhemisulfat von der des Prednisolonacetats ebenso abweicht wie beim normalen menschlichen Knochenmark, und zwar bezüglich

- der Änderung der Mitosehäufigkeit
- der Mitosephasenverteilung
- der Zellreifung.

II. Material und Methode

Das für die Versuche benötigte Knochenmark erhielten wir mittels Sternalpunktion von insgesamt vier Patienten. Ein kleiner Teil des gewonnenen Materials wurde sofort ausgestrichen, fixiert und nach Pappenheim gefärbt. Diese Originalpräparate lieferten uns neben dem für die Klinik wichtigen diagnostischen Ergebnis die Ausgangswerte für die Beurteilung der bei der Bebrütung eintretenden Zellveränderungen.

Das übrige Knochenmark wird in einem durch UV-Strahlung keimarm gehaltenen Raum unter sterilen Bedingungen auf das Kulturmedium gebracht. Es handelt sich hierbei um die von B o l l (7) modifizierte Carrel'sche Technik der Gewebezüchtung.

Als Nährboden diente ein Koagulum aus:

- 50 % autologem Nativplasma, das durch Sedimentation im silikonisierten Röhrchen gewonnen wurde
- 40 % autologem Serum
- 10 % Corhormon^R, dreifach verstärkt (Fa. Homburg)

Auf diese Koagula wurde jeweils ein Knochenmarkbröckchen aufgesetzt und zum Schutz gegen Austrocknen mit einem Serumtropfen überschichtet. Der Objektträger wurde mit einem Hohl-schliffobjektträger abgedeckt, mit Paraffin abgedichtet, umgedreht und als hängendes Koagulum in luftdicht verschlossener Kammer bei 37° C inkubiert.

Außer den Kontrollkulturen ohne Zusatz wurden Kulturen mit Prednisolonacetat- und Fluocortolonhemisulfat-Zusätzen angelegt. Diese Kulturen haben folgende Zusammensetzung:

- 50 % autologes Nativplasma
- 30 % autologes Serum
- 10 % Prednisolonacetat- oder Fluocortolonhemisulfat-Lösung
- 10 % Corhormon^R, dreifach verstärkt (Fa. Homburg)

Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat liegen im Nähr-

medium der Zusatzkulturen in Wirkungskonzentrationen von $2,5 \mu\text{g/ml}$ vor, so daß die Endkonzentration im Medium $0,25 \mu\text{g/ml}$ bei beiden Stoffen beträgt. Die Lagerung erfolgt ebenfalls bei 37°C im Brutschrank.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden von allen Kulturen jeweils drei Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

Ausgezählt wurde bei jedem Patienten nur das am besten zu beurteilende Präparat pro Stichprobe, wobei jeweils 2 000 Zellen erfaßt wurden. Die Zählung wurde mäanderförmig vorwiegend in den aufgelockerten Randpartien durchgeführt, und es wurden nur Zellen registriert, die eindeutig einer bestimmten Zellart zugeordnet werden konnten.

Für die Differenzierung gelten die Kriterien nach B o i l (7, 12).

a. In der roten Reihe wurden folgende Zellarten differenziert:

- Proerythroblast (PE)
- basophiler Erythroblast (bE)
- polychromatischer Erythroblast (pE)
- oxyphiler Erythroblast (oE)
- reifer Erythroblast (rE)

b. In der weißen Reihe wurden folgende Zellarten differenziert:

- Myeloblast (MB)
- Promyelozyt (PM)
- Myelozyt (My)
- eosinophiler Myelozyt (eo My)
- basophiler Myelozyt (b My)
- Promonozyt (PMo)
- Metamyelozyt (MM)
- stabkerniger Granulozyt (Stab)
- neutrophiler segmentkerniger Granulozyt (Seg)
- basophiler segmentkerniger Granulozyt (b Seg)

eosinophiler segmentkerniger Granulozyt (eo Seg)
Monozyt (Mo)

c. Die restlichen Zellen wurden differenziert in:

Lymphoblast
Lymphozyt
kleine Retikulumzelle
große Retikulumzelle
phagozytierende Retikulumzelle
Plasmoblast
Plasmazelle
Megakaryoblast
Megakaryozyt

Die Einteilung der Mitosephasen erfolgte nach Boll (7, 9):

1. Prophase (P)

= festes Spirem, kenntlich durch Auflösung der Kernmembran. Nucleoli sind nicht mehr vorhanden.

2. Frühe Metaphase (fM)

= lockeres Spirem; die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt.

3. Späte Metaphase (sM)

sternförmige Anordnung (= Monaster) der Chromosomen in der Äquatorialebene.

4. Anaphase (A)

Die getrennten Chromosomenpaare rücken polwärts auseinander (= Diaster). Die Zelle selbst ist noch rund oder ovalär.

5. Telophase (T)

= lockeres Dispirem; das Protoplasma zeigt eine deutliche Einschnürung.

6. Rekonstruktionsphase (R)

= festes Dispirem; die beiden Tochterzellen sind bis auf einen dünnen Cytoplasmafaden oder auch vollständig voneinander getrennt. Kernmembran und Nucleoli sind noch nicht sichtbar.

Teilungsfähig sind nach R o h r (49) folgende Zellen:

- Proerythroblast
- basophiler Erythroblast
- polychromatischer Erythroblast
- oxyphiler Erythroblast
- Myeloblast
- Promyelocyt
- Myelocyt
- Metamyelocyt
- Lymphoblast

Aus den Differentialzählungen bis zum 3. Tag in-vitro wird der prozentuale Anteil der einzelnen Zellarten graphisch in erythropoetischen und granulopoetischen Reifungskurven dargestellt. Auf der Ordinate wird die Zeit in Stunden angegeben, auf der Abszisse der prozentuale Anteil der Reifungsstufen von Granulopoese bzw. Erythropoese. Die Mittelwertkurven - getrennt nach Erythropoese und Granulopoese - für die vier Fälle ergeben sich nach Addition der Zellarten pro 24 Stunden und Ermittlung ihres prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl.

Die Mitoseindices geben die Zahl der Mitosen pro 1 000 teilungsfähigen Zellen wieder.

Das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese wird im G/E Index ermittelt.

Die karyologischen Kurven vermitteln uns jeweils für Erythropoese und Granulopoese die prozentuale Verteilung der Mitosephasen.

Nachfolgend werden die Versuche I - IV angeführt, gegliedert nach klinischer Diagnose, Knochenmarkbefund, Therapie und Blutbild vor dem Sternalpunktat.

V e r s u c h I Kurt H., 69 Jahre

Klin. Diagnose: Akute Leukose

Knochenmarkbefund: Akute Myeloblastenleukämie mit noch gut erhaltener Erythropoese. Reifungsstörung der Granulopoese und Megakaryozytopoese

Therapie bis zur Sternalpunktion am 3. 12. 73:

3 x 1/2 Tabl. Lanicor^R
3 x 40 Trpf. Bisolvon^R
3 x 2,0 g Binotal^R

Blutbild 1. 12. 73: Erythrozyten: 2,68 Mill/ μ l
 Hb: 7,8 g %
 HbE: 29,0 pg
 Leukozyten: 17 200/ μ l
 Myeloblasten: 89 %
 Segmentkernige: ' %
 Lymphozyten: 10 %
 Thrombozyten: 14 000/ μ l
 Anisocytose: +++
 Poikilocytose: +
 Polymorphie: ++
 Lymphozyten atypisch, z. T. Mikroblasten

Der Patient verstarb am 27. 3. 74 nach einer Pneumonie infolge Herz-Kreislaufversagens.

Versuch II

Erich K., 76 Jahre

Klin. Diagnose:

Akute Leukose

Knochenmarkbefund:

Akute Promonozytenleukämie bei verminderter Erythro- und Megakaryozytopoese

Therapie bis zur Sternalpunktion am 13. 5. 74:

30 Tropf. Tinctura Valeriana
2 Tabl. Salizell^R 0,5 g
20 Tropf. Novalgin^R
3 x 2,0 g Binotal^R
3 x 1/2 Tabl. Novodigal^R
3 x 40 Tropf. Bisolvon^R

Blutbild 10. 5. 74: Erythrozyten: 2,07 Mill/ μ l

Hb: 7,2 g %

HbE: 35,0 pg

Leukozyten: 96 000/ μ l

Atyp. Myeloblasten: 59 %

Promyelozyten: 2 %

Myelozyten: 10 %

Jugendliche: 4 %

Stabkernige: 11 %

Segmentkernige: 13 %

Lymphozyten: 1 %

Thrombozyten: 44 000/ μ l

Reticulocyten 56 %

Anisocytose: +

Polymorphie: +

Der Patient verstarb am 10. 6. 74 nach einer Pneumonie infolge Herz-Kreislaufversagens.

Versuch III Hertha K., 64 Jahre

Klin. Diagnose: Akute Leukose

Knochenmarkbefund: Akute Monoblastenleukämie mit überwiegender Verdrängung der Granulopoese, weniger der Erythropoese

Therapie bis zur Sternalpunktion am 17. 12. 73:

Nuransaft^R

1 g Ascorbinsäure tägl.

1 Amp. Depot-Primobolan^R alle 10 Tage

Blutbild 10. 12. 73: Erythrozyten: 2,91 Mill/ μ l

Hb: 8,8 g %

HbE: 29,8 pg

Leukozyten: 3 300/ μ l

Myeloblasten: 13 %

Parablasten: 32 %

Promyelozyten: 2 %

Metamyelozyten: 1 %

Stabkernige: 5 %

Segmentkernige: 8 %

Lymphozyten: 39 %

Anisozytose: ++

Polymorphie: +

Thrombozyten: 29 000/ μ l

Versuch IV E. S., 72 Jahre

Klin. Diagnose: Akute Leukose

Knochenmarkbefund: Akute Myeloblastenleukämie bei gesteigerter Erythropoese und kaum reifen Formen der Granulopoese

Therapie bis zur Sternalpunktion am 12. 6. 74:

3 x 1/2 Tbl. Novodigal^R
1 Tbl. Mandrax^R

Blutbild 13. 6. 74: Erythrozyten: 3,27 Mill/ μ l
Hb: 9,5 g %
HbE: 28,8 pg
Leukozyten: 2 000/ μ l
Myeloblasten: 10 %
Parablasten: 4 %
Metamyelozyten: 1 %
Stabkernige: 6 %
Segmentkernige: 14 %
Lymphozyten: 59 %
Monozyten: 3 %
Thrombozyten: 182 000/ μ l

Der Patient verstarb am 19. 8. 74 infolge Hirnblutung mit Ventrikeleinbruch.

III. Ergebnisse mit statistischer Auswertung

Unter Zuhilfenahme des χ^2 -Testes nach Pearson (in Geigy Documenta) (28) soll entschieden werden, ob die Differenzen hinsichtlich der Zellreifung zwischen den Kontrollkulturen und den Kulturen mit den Zusätzen Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat als zufällig anzusehen, oder ob sie statistisch als signifikant zu werten sind.

Für den jeweils errechneten χ^2 -Wert wird aus den χ^2 -Tafeln von B e l i t z (5) unter Berücksichtigung der entsprechenden Freiheitsgrade der Wahrscheinlichkeitswert P angegeben. Ist der Wert P kleiner als 0,01, so bedeutet das statistisch, daß die Differenz zwischen zwei Werten signifikant ist.

Die rote Reihe wurde nicht auf Signifikanz überprüft, da ein signifikantes Ergebnis wegen der niedrigen Zellzahl nicht zu erwarten ist.

In den Tabellen 7a, b, c und 8a, b, c sind die Berechnungen von χ^2 für die einzelnen Stichproben mit den dazugehörigen Werten für P für die Granulopoese von zwei Versuchen aufgeführt.

In den Tabellen bedeuten:

B = Beobachtungswert

E = Erwartungswert

P = Wahrscheinlichkeitswert.

Es wurden Knochenmarkkulturen von vier Patienten untersucht und bezüglich der Auswirkungen von Prednisolonacetat sowie Fluocortolonhemisulfat auf die Proliferation ausgewertet. Bei zwei der vier Patienten lautete die Knochenmarkdiagnose vor Versuchsbeginn akute myeloische Leukämie; die beiden anderen Patienten waren an akuter Monoblastenleukämie erkrankt.

Keiner dieser Patienten stand während oder kurz vor der Sternalpunktion unter einer Corticosteroidtherapie.

Als Maß für die Auswirkungen des Prednisolonacetat und des Fluocortolonhemisulfat auf die Proliferation dienten Reifungskurven, G/E-Indices, Mitoseindices und karyologische Kurven.

Insgesamt kamen 80 770 Zellen zur Auszählung. Außerdem wurden 211 Mitosen gezählt und nach Mitosephasen differenziert.

Auf den nachfolgenden Seiten werden in vier Versuchen die erythropoetischen und granulopoetischen Reifungskurven, sowie die G/E-Indices und die Mitoseindices der Kulturen mit den Zusätzen denen der Kontrollkulturen gegenübergestellt.

Versuch I (Kurt H.):

Vergleich der erythropoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 1)

In der Kontrolle zeigt sich eine leichte bis mäßige Verminderung der teilungsfähigen Zellen. Eine Ausnahme stellen nur die oxyphilen Erythroblasten dar, die stetig zunehmen. Die reifen Formen nehmen langsam zu, vermindern sich aber nach 72 Stunden leicht.

Bei den Proerythroblasten und den basophilen Erythroblasten liegen die Kurven der Zusätze und die Kontrollkurven nach 24 Stunden eng beieinander. Erst nach 48 Stunden trat bei den Zusätzen gleichermaßen eine stärkere Reifung auf als bei der Kontrolle. Während die polychromatischen Erythroblasten nach Zusatz von Fluocortolonhemisulfat geringere Reifungstendenz zeigen als nach Zusatz von Prednisolonacetat, ist bei den oxyphilen Erythroblasten bei keinem Zusatz eine Vermehrung zu verzeichnen.

Die reifen Formen nehmen nach Prednisolonacetat stetig zu, während nach Fluocortolonhemisulfat erst bei 72 Stunden eine deutliche Vermehrung bemerkt werden kann.

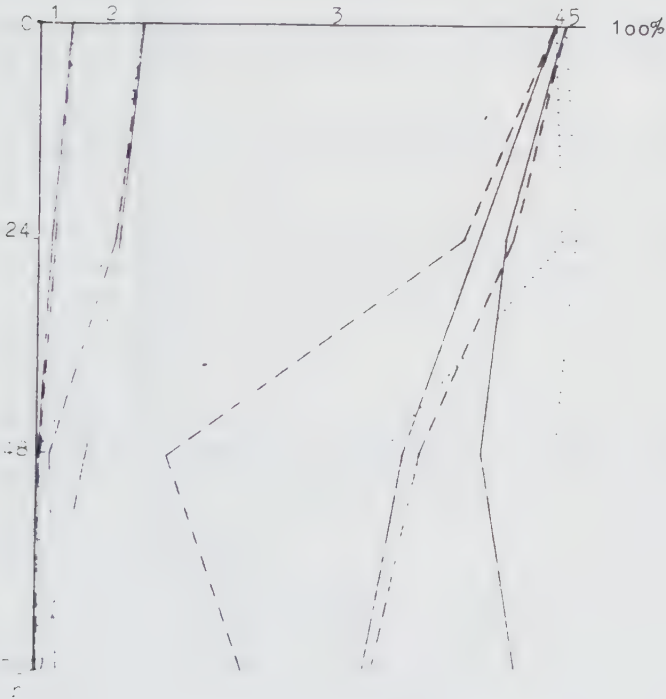
Vergleich der granulopoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 2)

Das Originalpräparat erscheint mit kleinen Myeloblasten überschwemmt; die übrigen Zellen der weißen Reihe werden kaum noch gefunden.

Die Reifungskurven zeigen in der Kontrolle eine mit der Zeit fortschreitende Abnahme der Myeloblasten bei geringer Zunahme der reiferen Zellformen.

Bei beiden Corticoidzusätzen fällt die starke Abnahme der Myeloblasten, besonders bei 48 Stunden, ins Auge bei entsprechender Zunahme der nachfolgenden teilungsfähigen Zellen. Sogar Stab- und Segmentkernige sind nach 48 und 72 Stunden sowohl bei Fluocortolonhemisulfat als auch Prednisolonacetat gegenüber der Kontrolle deutlich vermehrt.

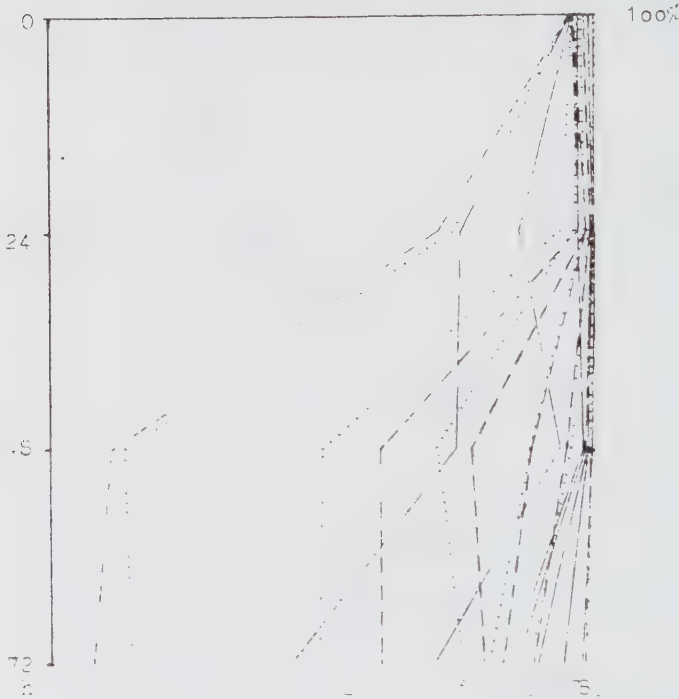
Abb. 1: Erythropoese (Kurt H.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



———— = Kontrolle
- - - - - = Prednisolonacetat
..... = Fluocortolonhemisulfat

- 1 = Proerythroblast (PE)
2 = basophiler Erythroblast (bE)
3 = polychromatischer Erythroblast (pE)
4 = oxyphiler Erythroblast (oE)
5 = reifer Erythroblast (rE)

Abb. 2: Granulopoese (Kurt H.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden.



———— = Kontrolle

- - - - - = Prednisolonacetat

..... = Fluocortolonhemisulfat

1 = Myeloblast (MB)

6 = stabkerniger Granulozyt (Stab)

2 = Promyelozyt (PM)

7 = neutrophiler segmentkerniger
Granulozyt (Seg)

3 = Myelozyt (My)

8 = eosinophiler segmentkerniger
Granulozyt (eo Seg)

4 = Promonozyt (PMo)

9 = Monozyt (Mo)

5 = Metamyelozyt (MM)

G/E Indices (Tab. 1, S.44)

Der G/E Index eines normalen Sternalpunktats liegt zwischen 2,6 und 3,4 (Rohr). Der vorliegende Wert von 3,98 ist für eine Leukämie nur leicht erhöht. Er fällt in den Kontrollkulturen stetig ab, was wohl ein Zeichen für das Zugrundegehen der Myeloblasten in vitro ist.

Auch nach Zusatz von Prednisolonacetat fällt der G/E-Index stetig ab, und zwar nach 48 Stunden schon stärker als in der Kontrolle.

Nach Zusatz von Fluocortolonhemisulfat steigt der Index nach 24 Stunden an, um jedoch nach 48 Stunden steil abzufallen; er liegt nach 48 Stunden noch unter dem des Prednisolonacetat.

Mitose-Indices (Tab. 2 und 4, S. 45 und 48)

Der rote Mitoseindex des Originalpräparates ist gegenüber der Norm von 25 bis 30 % (11) mäßig erhöht. Er fällt nach 24 Stunden stark ab, nach 48 Stunden mäßig und nach 72 Stunden nur noch gering.

Bei beiden Zusätzen fällt er nach 24 Stunden noch stärker als in der Kontrolle, bei Prednisolonacetat etwas stärker als bei Fluocortolonhemisulfat. Während in der Fluocortolonhemisulfatkultur nach 48 Stunden und 72 Stunden keine Beurteilung möglich war, da kaum Mitosen registriert werden konnten, fällt der Mitoseindex bei Prednisolonacetat nach 48 Stunden nur noch leicht ab, um nach 72 Stunden gleichzubleiben.

Der weiße Mitoseindex ist im Originalpräparat extrem niedrig und nimmt in der Kontrolle nach 24 Stunden stark zu, um nach 48 und 72 Stunden wenig abzufallen. In den Corticoidkulturen erhöht sich der Index nach 24 Stunden weniger, bei Fluocortolonhemisulfat etwas mehr als bei Prednisolonacetat.

In der Fluocortolonhemisulfatkultur war mangels Mitosen wiederum keine Beurteilung der 48- und 72 Stundenwerte möglich. Die Werte für Prednisolonacetat stiegen bei 48 Stunden mäßig und bei 72 Stunden leicht an und übertrafen nun jeweils die Kontrollwerte.

Versuch II (Erich K.):

Vergleich der erythropoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 3)

Die Kontrollkultur zeigt eine stetige Ausreifung der ausgangs stark linksverschobenen Erythroblasten bis 48 Stunden, jedoch nehmen im 72-Stunden-Präparat die reifen Formen wieder leicht ab.

Im Gegensatz dazu zeigen beide Zusatzkulturen bei 24 Stunden eine geringere Reifungstendenz; bei der Kultur mit Fluocortolonhemisulfatzusatz sind dabei noch weniger reife Formen vorhanden als bei dem Prednisolonacetatzusatz. Während die Prednisolonacetatkultur bei 48 Stunden aber schon eine stärkere Reifung aufweist als die Kontrollkultur, zeigt die Fluocortolonhemisulfatkultur erst bei 72 Stunden ihre stärkste Reifung.

Vergleich der granulopoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 4)

Die Kontrollkultur zeigt eine stete Verminderung der zu Beginn nur wenig vermehrten Myeloblasten und der Promonozyten. Demgegenüber kommt es zu einer mit der Zeit fortschreitenden Zunahme der Monozyten.

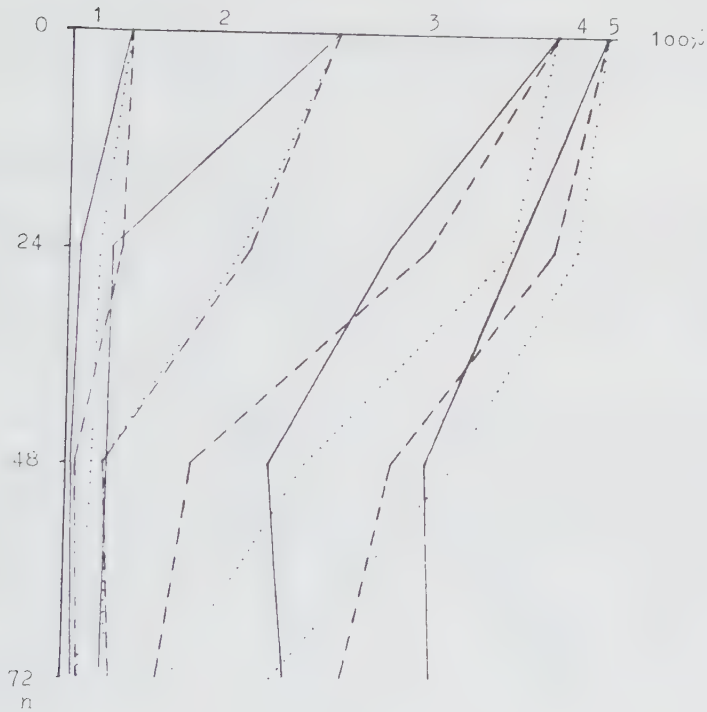
Bei beiden Zusätzen kommt es - vor allem nach 24 Stunden - zu einer stärkeren Verminderung der Myeloblasten und Promonozyten als in den Kontrollkulturen.

Auch die Ausreifung der Promonozyten ist in den Kulturen mit Zusatz stärker als in der Kontrolle ausgeprägt. Dabei zeigt sich, daß zu allen Zeiten die Kulturen mit Fluocortolonhemisulfat eine größere Reifungstendenz aufweisen als die Kulturen mit Prednisolonacetatzusatz.

G/E-Indices (Tab. 1, S. 44)

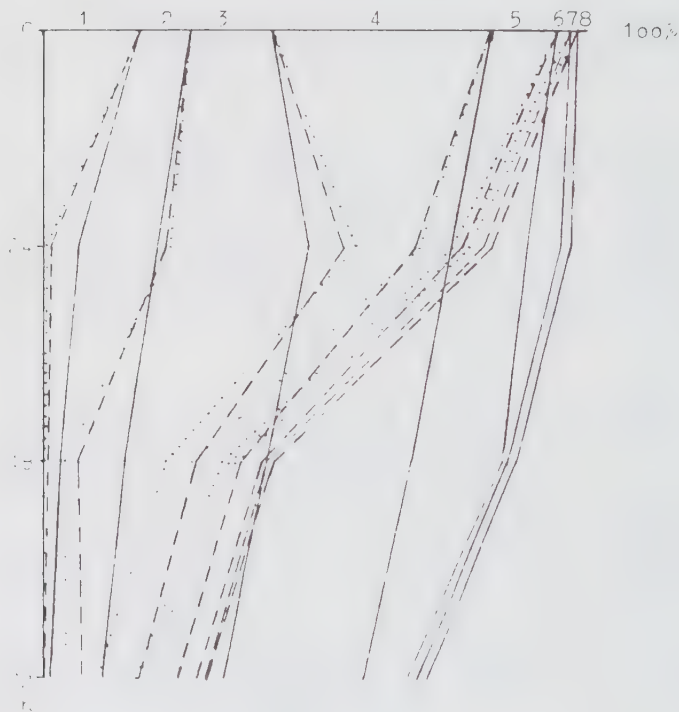
Der zu Beginn erhöhte G/E-Index der Kontrollkultur steigt bei 24 Stunden mäßig an, um bei 48 Stunden mäßig und bei 72 Stunden weiter leicht abzufallen.

Abb. 3: Erythropoese (Erich K.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



————— = Kontrolle
 - - - - - = Prednisolonacetat
 = Fluocortolonhemisulfat
 1 = PE
 2 = bE
 3 = pE
 4 = oE
 5 = rE

Abb. 4: Granulopoese (Erich K.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



- = Kontrolle
 - - - - - = Prednisolonacetat
 = Fluocortolonhemisulfat
- 1 = MB 5 = MM
 2 = PM 6 = Stab
 3 = My 7 = Seg
 4 = PMo 8 = Mo

Im Gegensatz dazu steigen die G/E-Indices sowohl der Fluocortolonhemisulfatkultur als auch der Prednisolonacetatkultur bei 24 und 48 Stunden kräftig an und fallen erst bei 72 Stunden. Sie sind jedoch zu allen Zeiten höher als in der Kontrolle, wobei die Werte der Prednisolonacetatkultur jeweils die der Fluocortolonhemisulfatkulturen übertreffen.

Mitoseindices (Tab. 2 und 4, S. 45 und 48)

In der Erythropoese ist eine vergleichende Betrachtung nicht möglich, da in den einzelnen Kulturen zu wenig bzw. gar keine Mitosen gezählt werden konnten.

In der Granulopoese fällt der Mitoseindex in den Kontrollkulturen stetig ab.

Der Index bei den Kulturen mit Zusatz fällt nur nach 24 Stunden unter den Wert der Kontrolle und übersteigt bei 48 Stunden wieder den Kontrollwert. Während der Mitoseindex für den Prednisolonacetatzusatz bei 72 Stunden weiter ansteigt, ist er für den Fluocortolonhemisulfatzusatz wiederum nicht zu ermitteln.

Versuch III (Hertha K.):

Vergleich der erythropoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 5)

Die Reifungskurven zeigen in den Kontrollen eine mit der Zeit leicht fortschreitende Zunahme der reifen Erythroblasten mit entsprechender Abnahme der unreifen Zellformen.

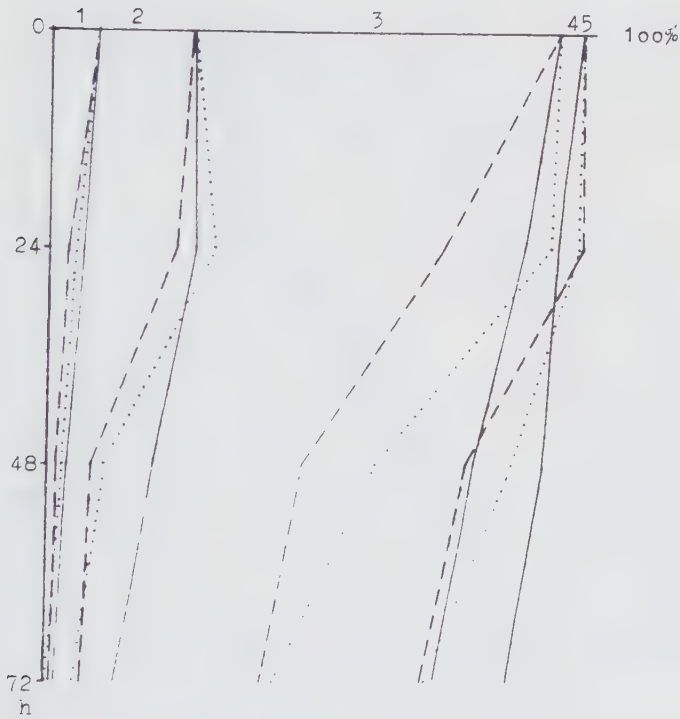
Bei beiden Zusätzen ist nach 24 Stunden noch keine Reifung eingetreten. Nach 48 Stunden und nach 72 Stunden ist die Zunahme von reifen Erythroblasten jedoch stärker als in der Kontrolle, und zwar ist sie beim Prednisolonacetatzusatz deutlicher als beim Fluocortolonhemisulfatzusatz. Auch bei den übrigen Erythroblasten ist die Reifung nach Prednisolonacetatzusatz gegenüber der Kontrolle ausgeprägter als nach Fluocortolonhemisulfatzusatz.

Vergleich der granulopoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 6)

In den Kontrollkulturen fällt der steile Abfall der Prozentzahl der Myeloblasten nach 24 Stunden auf. Der Anteil der Promonozyten ist nach 24 Stunden stark vermehrt, fällt aber nach 48 und 72 Stunden wieder ab. Stab- und Segmentkernige erfahren nach 24 Stunden eine Abnahme, steigen jedoch nach 48 und 72 Stunden jeweils leicht an. Auch durch die Zunahme der Monozyten, die zwischen 24 und 48 Stunden am stärksten ist, wird die Reifung dokumentiert.

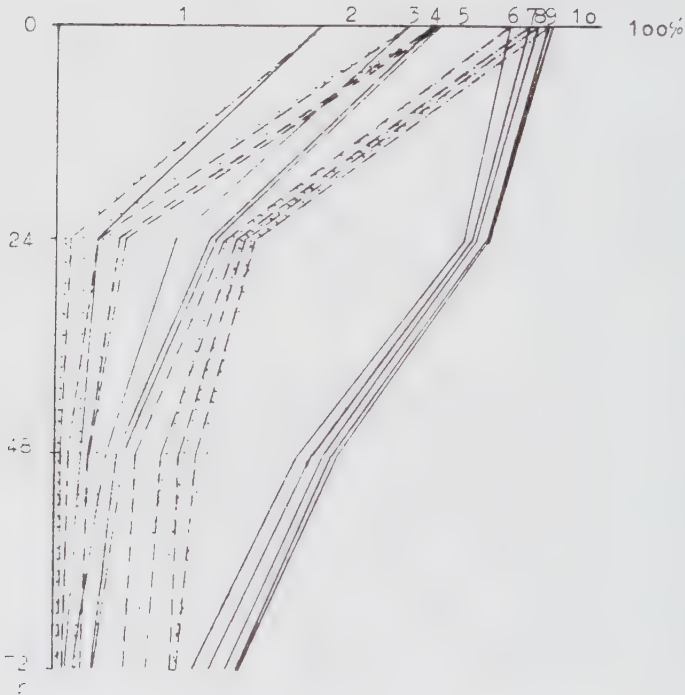
Es muß an dieser Stelle betont werden, daß die Differenzierung zwischen Promonozyt und Monozyt sehr streng gehandhabt wurde, so daß - besonders in den 24 Stunden-Präparaten - die Zelle im Zweifelsfall, wenn der Kern schon leicht gebuchtet, das Cytoplasma aber rauchgrau gefärbt und unstrukturiert war, noch den Promonozyten zugerechnet wurde. Beide Zusatzkulturen zeigen jeweils eine stärkere Ausreifungstendenz gegenüber den Kontrollpräparaten, wobei die Myeloblasten in den Fluocortolonhemisulfatkulturen gegenüber den Prednisolonacetatkulturen etwas mehr abnehmen und die Stabkernigen in den Prednisolonacetat - gegenüber den Fluocortolonhemisulfatkulturen - etwas mehr zunehmen.

Abb. 5: Erythropoese (Hertha K.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



———— = Kontrolle
- - - - - = Prednisolonacetat
... .. = Fluocortolonhemisulfat
1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = oE
5 = rE

Abb. 6: Granulopoesse (Hertha K.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



———— = Kontrolle

- - - - - = Prednisolonacetat

. = Fluocortolonhemisulfat

1 = MB

6 = MM

2 = PM

7 = Stab

3 = My

8 = Seg

4 = eo My

9 = eo Seg

5 = PMo

10 = Mo

G/E-Indices (Tab. 1, S.44)

In der Kontrollkultur nimmt der G/E-Index nach 24 Stunden leicht zu, um nach 48 und 72 Stunden wieder zu sinken.

Die G/E-Indices der Zusatzkulturen verhalten sich ähnlich. Sie liegen eng beieinander, wobei die Werte der Fluocortolon-hemisulfatkulturen bis auf den 24 Stunden-Wert etwas geringer sind als bei den Prednisolonacetatkulturen. Beide Werte liegen etwas unter den zugehörigen Kontrollwerten.

Mitose-Indices (Tab. 2 u. 4, S. 45 u. 48)

In der roten Reihe kommt es nach 24 Stunden in der Kontrolle zu einem Anstieg des Mitoseindex und danach zu einem kontinuierlichen Absinken der Werte.

In den Zusatzkulturen liegen die Werte erheblich niedriger als in den Kontrollkulturen. Die Werte in den Prednisolonacetatkulturen sind ungefähr halb so groß wie die der Fluocortolon-hemisulfatkulturen; allerdings darf dieses Ergebnis nicht überbewertet werden, da oft nur eine Mitose pro Präparat gefunden wurde, und somit eine ernsthafte Beurteilung unmöglich ist.

In der weißen Reihe bleibt der niedrige Mitoseindex der Kontrolle über die gesamte Kulturzeit fast gleich.

In den Prednisolonacetatkulturen erscheinen die Werte gegenüber den Kontrollen und dem Originalpräparat verdreifacht, wohingegen der Mitoseindex im Fluocortolonhemisulfatmedium nur gering ansteigt.

Versuch IV (Edith S.):

Vergleich der erythropoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 7)

Die Kontrollkurven zeigen nach 24 Stunden einen starken Abfall der Proerythroblasten und besonders der basophilen Erythroblasten, die im Originalpräparat stark vermehrt sind, und einen Anstieg der polychromatischen sowie oxyphilen Erythroblasten. Nach 24 Stunden ist auch eine Reifung im Sinne einer Zunahme der reifen Erythroblasten zu verzeichnen, die sich aber nach 48 und 72 Stunden nicht fortsetzt.

Die Zusatzkulturen verhalten sich recht ähnlich wie die Kontrollkulturen. Die Kurven der Fluocortolonhemisulfatzusätze weisen, besonders nach 24 Stunden, gegenüber denen der Prednisolonacetatzusätze eine leichte bis mäßige Linksverschiebung auf, worin eine etwas stärker aktivierte Ausreifung zum Ausdruck kommt.

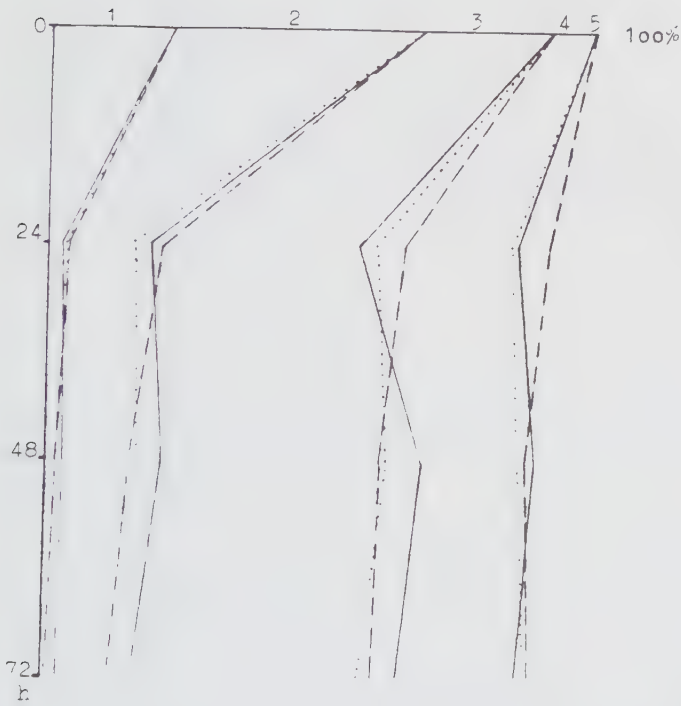
Vergleich der granulopoetischen Reifungskurven von Kontroll- und Zusatzkulturen (Abb. 8)

Auch hier verhalten sich die Kurven der Kulturen mit Zusatz recht ähnlich wie die der Kontrollkulturen.

In der Kontrolle fällt die Myeloblastenzahl pro Zeiteinheit fast linear ab. Während das Absinken der Myeloblastenzahl bei Fluocortolonhemisulfatzusatz ziemlich parallel zur Kontrollkurve verläuft, ist die Kurve bei Prednisolonacetatzusatz mäßig links verschoben.

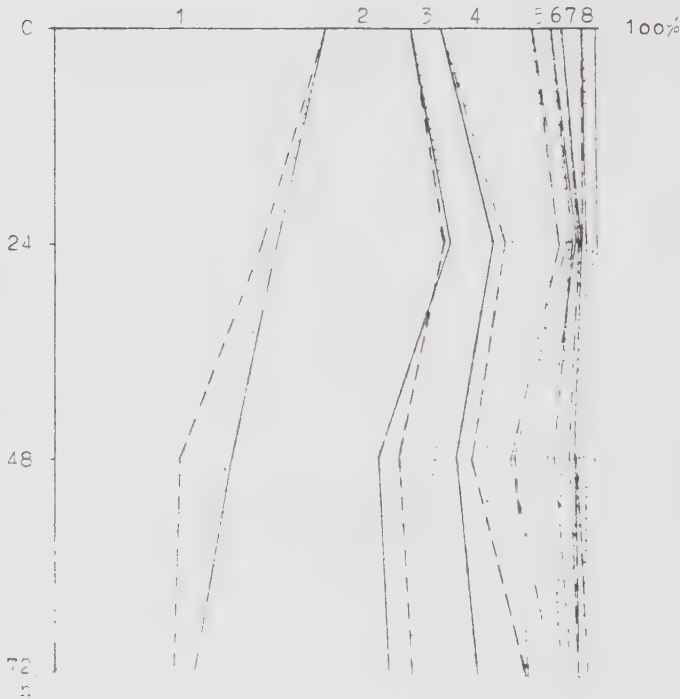
Die Promonozytenzahl nimmt bei Kontrolle und Zusätzen stetig ab, bei Prednisolonacetat- und Fluocortolonhemisulfatzusätzen in gleichem Maß und etwas stärker als in der Kontrolle. Die Schwankungen in der Anzahl der stabkernigen und der segmentkernigen Granulozyten sowie der Monozyten können nicht als Reifung gewertet werden.

Abb. 7: Erythropoese (Edith S.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



————— = Kontrolle
 - - - - - = Prednisolonacetat
 = Fluocortolonhemisulfat
 1 = PE
 2 = bE
 3 = pE
 4 = oE
 5 = rE

Abb. 8: Granulopoese (Edith S.) prozentual aufgetragen
nach 24, 48 und 72 Stunden



- = Kontrolle
 - - - = Prednisolonacetat
 = Fluocortolonhemisulfat
- 1 = MB 5 = MM
 2 = PM 6 = Stab
 3 = My 7 = Seg
 4 = PMo 8 = Mo

G/E-Indices (Tab. 1, S.44)

Der G/E-Index des Originalpräparates liegt mit 1,6 sehr niedrig und weist auf eine ineffektive Erythropoese als Ursache der Anämie hin.

Die Werte fallen sowohl in der Kontrolle als auch in den Kulturen mit Zusatz konstant ab. Dabei liegen die Werte für den Prednisolonacetatzusatz stets unter den Kontrollwerten, wohingegen die Werte für den Fluocortolonhemisulfatzusatz, bis auf den 72 Stundenwert, über den Kontrollwerten liegen.

Mitose-Indices (Tab. 2 u. 4, S.45 u. 48)

Die roten und weißen Mitose-Indices nehmen mit steigender Kulturzeit sowohl in den Kontrollen als auch in den Zusatzkulturen ständig ab. Auffällig ist der hohe weiße Mitose-Index im Originalpräparat.

Dabei liegen die Werte der Zusatzkulturen in der Erythropoese bei 24 Stunden noch über den Kontrollwerten, bei 48 und 72 Stunden knapp darunter.

In der Granulopoese liegen die Werte der Zusatzkulturen zu allen Zeiten unter den Kontrollwerten, wobei die Mitose-Indices der Prednisolonacetatkulturen jedesmal niedriger sind als die der Fluocortolonhemisulfatkulturen.

Die Reifungskurven aller vier Patienten werden in der erythropoetischen (Abb. 9) und in der granulopoetischen (Abb. 10) Mittelwertskurve zusammengefaßt:

In der Erythropoese (Abb. 9) zeigen die Mittelwerte der Kontrollkulturen eine ausgeprägte Zunahme der reifen Zellen, besonders nach 24stündiger Bebrütungszeit, mit langsam fortschreitender Ausreifung nach 48 und 72 Stunden. Gleichzeitig nehmen die teilungsfähigen Zellen ab, wie es auch von Boll (7,10,11,12) beschrieben wurde.

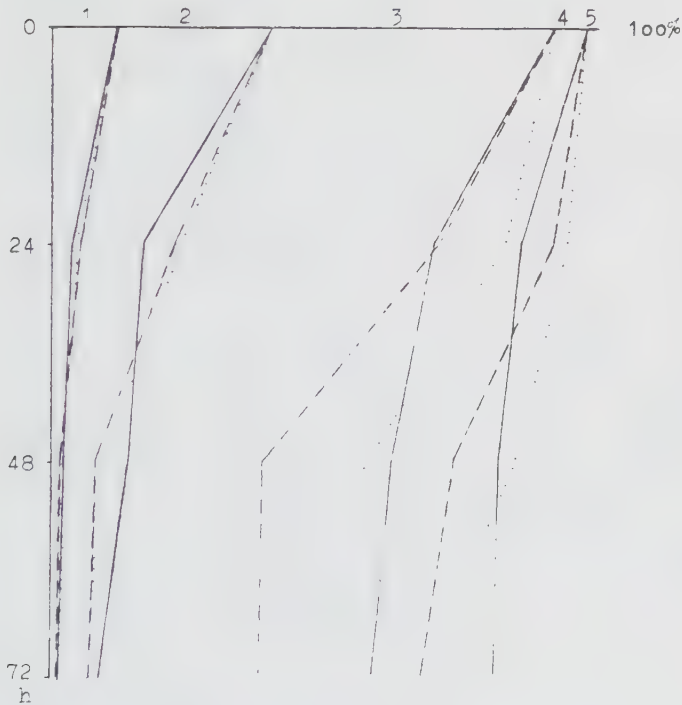
Nach beiden Zusätzen ist nach 24 Stunden in den Mittelwertkurven nur eine schwache Reifungszunahme eingetreten.

Während sich in den Kulturen mit Prednisolonacetatzusätzen aber nach 48 Stunden im Mittel eine stärkere Ausreifungstendenz abzeichnet, die sich bis 72 Stunden fortsetzt, liegt die Ausreifung in den Kulturen mit Fluocortolonhemisulfatzusätzen auch noch nach 48 Stunden unter der Kontrolle und nähert sich erst nach 72 Stunden an den Wert der Prednisolonacetatkulturen an.

In der Granulopoese (Abb. 10) wird in den Mittelwerten der Kontrollkulturen eine fortschreitende Verminderung der Myeloblasten deutlich. Während die Prozentzahlen der Promyelozyten und der Myelozyten nach 24stündiger Bebrütungszeit leicht ansteigen, bleibt die Fraktion der Stab- und Segmentkernigen während der gesamten Versuchsdauer ziemlich konstant. Die Promonozytenzahl erhöht sich nach 24 Stunden geringfügig und fällt bis 72 Stunden weiter ab, während die Monozytenzahl ständig zunimmt.

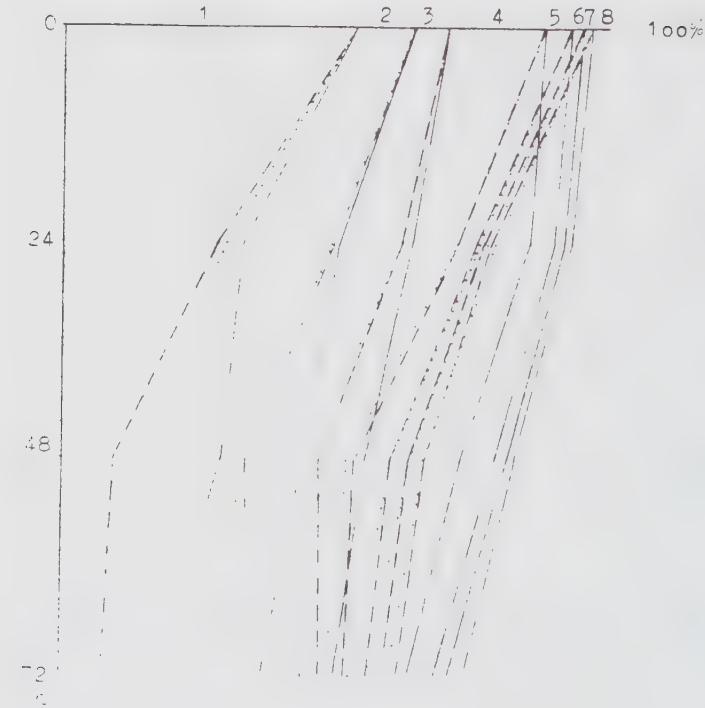
Der Vergleich der Mittelwertkurven deutet auf eine ähnliche Wirkungsweise beider Zusätze hin. Beide führen zu einer zeitproportional stärkeren Ausreifung der Myeloblasten gegenüber den Kontrollwerten, wobei die Wirkung des Prednisolonacetatzusatzes leicht überwiegt. Nach 24 Stunden kommt es bei beiden zu einem stärkeren Anstieg der Promyelozytenzahl als in der Kontrolle.

Abb. 9: Mittelwertkurven Erythropoese von Versuch I - IV
prozentual aufgetragen nach 24, 48 und 72 Stunden



———— = Kontrolle
- - - - - = Prednisolonacetat
... .. = Fluocortolonhemisulfat
1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = oE
5 = rE

Abb. 10: Mittelwertkurve Granulopoese von Versuch I - IV
prozentual aufgetragen nach 24, 48 und 72 Stunden



- = Kontrolle
 - - - - - = Prednisolonacetat
 = Fluocortolonhemisulfat
- | | |
|---------|----------|
| 1 = MB | 5 = MM |
| 2 = PM | 6 = Stab |
| 3 = My | 7 = Seg |
| 4 = PMo | 8 = Mo |

Die Ausreifung der Promonozyten ist bei beiden Zusätzen gleich und wesentlich stärker, als es den Kontrollmittelwerten entspricht. Die Stab- und Segmentkernigen vermehren sich gleichermaßen geringfügig gegenüber den Kontrollwerten.

Zusammenfassung der G/E-Indices (Tab. 1, S. 44)

Der mittlere G/E-Index aller Patienten liegt in den Originalpräparaten deutlich über dem Wert eines normalen Myelogramms, was wegweisend für die gesteigerte Granulopoese ist. Bei 24 Stunden steigt der Kontrollwert leicht an, um schrittweise nach 48 und 72 Stunden unter den Ausgangswert abzufallen.

Nach beiden Zusätzen steigen die arithmetischen Mittelwerte nach 24 Stunden stärker an als in der Kontrolle. Während der G/E-Index bei Prednisolonacetatzusatz nach 48 Stunden noch höher liegt und erst nach 72 Stunden abfällt, sinkt der Wert bei Fluocortolonhemisulfatzusatz schon nach 48 Stunden wieder und erreicht nach 72 Stunden seinen tiefsten Wert.

Bei beiden Zusätzen liegen die Werte zu allen Zeiten höher als in den entsprechenden Kontrollkulturen; dies ist aber nur auf den 2. Versuch zurückzuführen.

Zusammenfassung der Mitose-Indices (Tab. 2 u. 4, S. 45 u. 48)

In der Erythropoese zeigen die mittleren Mitose-Indices sowohl in der Kontrolle als auch bei beiden Zusätzen fallende Tendenz. Nur der 48-Stunden-Wert des Prednisolonacetatzusatzes übertrifft den Kontrollwert. Sonst liegen die Werte der Zusatzkulturen deutlich unter denen der Kontrollkulturen, was auf eine durch die Zusätze bedingte Hemmung der Erythropoese hinweisen würde. Allerdings ist dieses Ergebnis nur mit Vorbehalt zu würdigen, da in zwei Fällen nur extrem wenige bzw. gar keine Mitosen bei Erythroblasten gefunden werden konnten.

Die weißen Mitose-Indices der Kontrollkulturen fallen mit der Dauer der Bebrütungszeit ebenfalls ab.

Die mittleren Werte bei den Fluocortolonhemisulfatzusätzen fallen nach 24 Stunden ebenfalls wieder ab, steigen dann leicht an, und sinken nach 72 Stunden wieder leicht unter den Kontrollwert. Die Werte bei den Prednisolonacetatzusätzen fallen dagegen nach 24 Stunden noch unter den Kontrollwert, steigen dann jedoch nach 48 Stunden und besonders nach 72 Stunden wieder an; dadurch wird die stimulierende Wirkung des Prednisolonacetatzusatzes auf die Granulopoese signalisiert.

Mitosephasenverteilung (Abb.11 u.12, Tab.6, Lit. 51,52,53)

Es wurde eine graphische Darstellung angefertigt, in die die absoluten Zahlen aller gefundenen Mitosen - getrennt nach Granulopoese und Erythropoese - eingingen.

Es zeigt sich, daß sowohl in der granulopoetischen als auch in der erythropoetischen karyologischen Kurve weitgehende Übereinstimmung hinsichtlich der Mitosephasenverteilung zwischen den Kontrollkulturen und den Kulturen mit Zusätzen herrscht. Ein Einfluß der beiden verwendeten Zusätze auf den Mitoseablauf läßt sich somit nicht nachweisen.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß aufgrund der geringen Zahl der Mitosen in der Erythropoese hier eine tiefgreifende Würdigung des Ergebnisses nicht zulässig ist.

Zellmorphologie

In den Originalausstrichen wurden nur vereinzelt megalo-blastoide Formen gefunden. Auch in den Zusatzkulturen wurden nur in geringem Maß morphologische Veränderungen beobachtet, wie verwaschene Kernstrukturen, Auflösung der Kernmembran und Atypie der Kernform.

Es ließen sich aber keine Häufungen erkennen, die für bestimmte Kulturen als spezifisch angesehen werden könnten.

Mikroformen wurden nur vereinzelt und dann vorwiegend in der 72-Stunden-Kultur gefunden.

Nachfolgend werden in den Tabellen 1 - 5 die G/E-Indices sowie die roten und weißen Mitoseindices der Kontrollkulturen denen der Zusatzkulturen gegenübergestellt. Außerdem werden die Mitosen der Erythropoese und der Granulopoese nach 24, 48 und 72 Stunden durch den χ^2 -Test auf Signifikanz überprüft. In Abb. 11 und 12 werden die mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese und der Granulopoese graphisch dargestellt.

Tab. 1: G/E-Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen

	<u>Kontrolle</u>			
	0	24	48	72
	Std.	Std.	Std.	Std.
Versuch 1 (Mbl)	3,98	2,90	1,93	0,61
Versuch 2 (Mobl)	8,45	12,0	7,46	6,84
Versuch 3 (Mobl)	6,46	7,45	7,15	5,26
Versuch 4 (Mbl)	1,60	1,35	1,13	1,15
Arith. Mittel	5,12	5,92	4,41	3,46

	<u>Prednisolonacetat</u>			
Versuch 1 (Mbl)	2,80	0,50	0,36	
Versuch 2 (Mobl)	17,81	24,40	14,20	
Versuch 3 (Mobl)	7,30	5,78	4,34	
Versuch 4 (Mbl)	1,25	1,12	0,78	
Arith. Mittel	7,29	7,95	4,92	

	<u>Fluocortolonhemisulfat</u>			
Versuch 1 (Mbl)	5,90	0,37	0,19	
Versuch 2 (Mobl)	12,80	20,40	9,63	
Versuch 3 (Mobl)	8,10	5,38	3,52	
Versuch 4 (Mbl)	1,83	1,47	0,91	
Arith. Mittel	7,15	6,90	3,56	

Mbl = Myeloblastenleukämie

Mobl = Monoblastenleukämie

Tab. 2: Rote Mitose-Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen
(in Promille)

	<u>Kontrolle</u>			
	0	24	48	72
	Std.	Std.	Std.	Std.
Versuch 1 (Mbl)	39,59	10,9	2,17	2,65
Versuch 2 (Mobl)	(5,02)	(8,0)	(7,5)	(6,6)
Versuch 3 (Mobl)	19,0	27,1	15,4	4,6
Versuch 4 (Mbl)	12,85	5,0	5,05	3,87
Arith. Mittel	19,09	12,7	7,53	4,28

	<u>Prednisolonacetat</u>		
Versuch 1 (Mbl)	2,49	1,31	1,51
Versuch 2 (Mobl)	11,0	22,2	-
Versuch 3 (Mobl)	(5,13)	(5,71)	(5,45)
Versuch 4 (Mbl)	7,18	4,02	3,04
Arith. Mittel	6,45	8,31	2,50

	<u>Fluocortolonhemisulfat</u>		
Versuch 1 (Mbl)	3,72	-	-
Versuch 2 (Mobl)	-	-	-
Versuch 3 (Mobl)	11,9	10,1	-
Versuch 4 (Mbl)	6,02	5,1	-
Arith. Mittel	5,41	3,90	-

Mbl = Myeloblastenleukämie

Mobl = Monoblastenleukämie

Tab. 3: χ^2 -Test Mitosen, Erythropoese

24 Std.-Prednisolonacetat

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontr.	14	1262	1276	10,49	1265,51
Zusatz	8	1400	1408	11,54	1396,46
Summe	22		2684		

$$\chi^2_1 = 1,4760 \quad P > 0,05 \quad (\text{nicht signifikant})$$

24 Std.-Fluocortolonhemisulfat

Kontr.	14	1262	1276	10,90	1265,10
Zusatz	6	1059	1065	9,09	1055,90
Summe	20		2341		

$$\chi^2_1 = 1,9365 \quad P > 0,05 \quad (\text{nicht signifikant})$$

48 Std.-Prednisolonacetat

Kontr.	9	1569	1578	7,15	1570,85
Zusatz	6	1725	1731	7,84	1723,16
Summe	15		3309		

$$\chi^2_1 = 0,9104 \quad P > 0,05 \quad (\text{nicht signifikant})$$

Fortsetzung Tab. 3: χ^2 -Test Mitosen, Erythropoese

48 Std.-Fluocortolonhemisulfat

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontr.	9	1569	1578	6,07	1571,93
Zusatz	5	2053	2058	7,92	050,08
Summe	14		3636		

$$\chi^2_1 = 2,4908 \quad P > 0,05 \quad (\text{nicht signifikant})$$

72 Std.-Prednisolonacetat

Kontr.	7	2113	2120	6,31	2113,69
Zusatz	5	1903	1908	5,68	1902,32
Summe	12		4028		

$$\chi^2_1 = 0,1559 \quad P > 0,05 \quad (\text{nicht signifikant})$$

Beim Fluocortolonhemisulfatzusatz wurden in der 72-Stunden-Kultur keine Mitosen gefunden.

Tab. 4: Weiße Mitose-Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen
(in Promille)

	<u>Kontrolle</u>			
	0	24	48	72
	Std.	Std.	Std.	Std.
Versuch 1 (Mb1)	0,15	4,0	3,7	3,32
Versuch 2 (Mb1)	7,5	4,83	3,91	2,92
Versuch 3 (Mb1)	5,4	4,49	4,18	4,99
Versuch 4 (Mb1)	24,0	13,2	9,04	8,28
Arith. Mittel	9,26	6,64	5,21	4,87

	<u>Prednisolonacetat</u>		
Versuch 1 (Mb1)	1,48	7,05	9,2
Versuch 2 (Mb1)	2,87	3,98	10,1
Versuch 3 (Mb1)	10,30	11,00	17,5
Versuch 4 (Mb1)	8,73	5,67	5,02
Arith. Mittel	5,84	6,92	10,45

	<u>Fluocortolonhemisulfat</u>		
Versuch 1 (Mb1)	1,9	-	-
Versuch 2 (Mb1)	2,23	4,81	-
Versuch 3 (Mb1)	4,13	8,85	7,8
Versuch 4 (Mb1)	9,95	7,42	8,65
Arith. Mittel	4,57	5,27	4,11

Mb1 = Myeloblastenleukämie
Mb1 = Monoblastenleukämie

Tab. 5: χ^2 -Test Mitosen, Granulopoese

24 Std.-Prednisolonacetat

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontr.	30	4912	4942	26,63	4915,37
Zusatz	19	4132	4151	22,36	4128,64
Summe	49		9093		

$\chi^2_1 = 0,9313$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

24 Std.-Fluocortolonhemisulfat

Kontr.	30	4912	4942	24,97	4917,03
Zusatz	17	4341	4358	22,02	4335,98
Summe	47		9300		

$\chi^2_1 = 2,1576$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

48 Std.-Prednisolonacetat

Kontr.	20	3949	3969	21,22	3947,78
Zusatz	14	2375	2389	12,77	2376,23
Summe	34		6358		

$\chi^2_1 = 0,1885$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

Fortsetzung Tab. 5: χ^2 -Test Mitosen, Granulopoese

48 Std.-Fluocortolonhemisulfat

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontr.	20	3949	3969	20,89	3948,11
Zusatz	13	2287	2300	12,10	2287,90
Summe	33		6269		

$\chi^2 = 0,1048$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

72 Std.-Prednisolonacetat

Kontr.	15	2982	2997	18,56	2978,44
Zusatz	15	1832	1847	11,43	1835,57
Summe	30		4844		

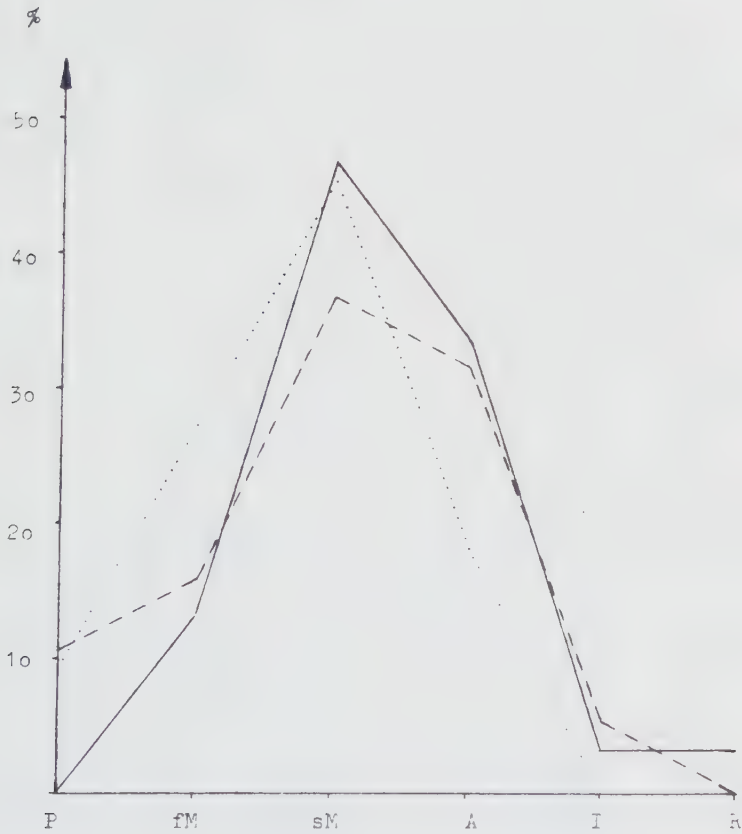
$\chi^2 = 1,7978$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

72 Std.-Fluocortolonhemisulfat

Kontr.	15	2982	2997	15,09	2981,91
Zusatz	8	1562	1570	7,90	1562,10
Summe	23		4567		

$\chi^2 = 0,0017$ $P > 0,05$ (nicht signifikant)

Abb. 11: Mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese von Versuch I - IV prozentual aufgetragen



———— = Kontrolle

- - - - - = Prednisolonacetat

. = Fluocortolonhemisulfat

P = Prophase

A = Anaphase

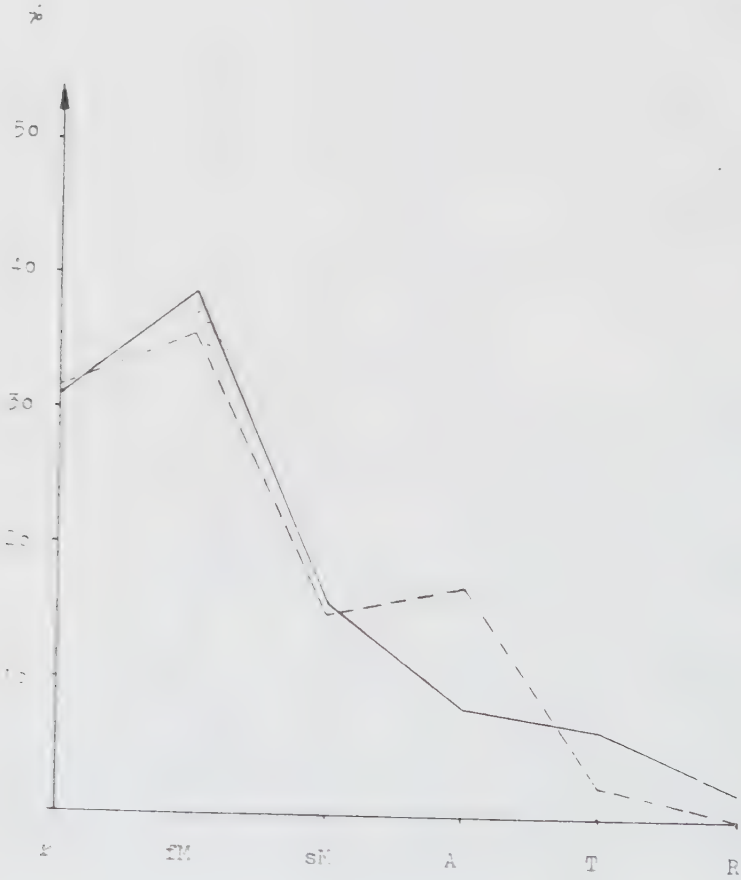
fM = frühe Metaphase

T = Telophase

sM = späte Metaphase

R = Rekonstruktionsphase

Abb. 12: Mittlere Mitosephasenverteilung der Granulopoese von Versuch I - IV prozentual aufgetragen.



———— = Kontrolle

- - - - - = Prednisolonacetat

. = Fluocortolonhemisulfat

P = Prophase

A = Anaphase

FM = frühe Metaphase

T = Telophase

SM = späte Metaphase

R = Rekonstruktionsphase

Tab. 6: Mitosephasenverteilung

Erythropoese

	P	FM	SM	A	T	R	zus.
Orig./Kontrolle	2/-	4/4	5/14	7/10	3/1	4/1	25/30
Prednisolonacetat	2	3	7	6	1	-	19
Fluocortolonhemisulfat	1	3	5	2	-	-	11

Granulopoese

Orig./Kontrolle	15/20	7/25	9/10	5/5	4/4	1/1	41/65
Prednisolonacetat	15	17	7	8	1	-	48
Fluocortolonhemisulfat	13	14	9	2	-	-	38

Um zu ermitteln, ob in allen vier Versuchen signifikante Ergebnisse vorliegen, genügt es, die Signifikanz von Versuch 2 und 4 nachzuweisen. Gelingt dies, so sind auch in Versuch 1 und 3 signifikante Werte anzunehmen, wie aus den graphischen Darstellungen zu entnehmen ist. In Tabelle 7a, b, c wird die Granulopoese von Versuch 2 mittels des χ^2 -Testes auf Signifikanz überprüft. Es zeigen sich signifikante Abweichungen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 und 72 Stunden. In Versuch 4 wurden mit Ausnahme der 24 Stunden-Werte der Prednisolonacetatkultur und der 72 Stunden-Werte der Fluocortolonhemisulfatkultur ebenfalls signifikante Ergebnisse ermittelt. Es kann daher angenommen werden, daß in allen vier Versuchen in der Granulopoese signifikante Ergebnisse zwischen den Kontrollkulturen und den beiden Zusätzen erzielt wurden.

Tab. 7a: χ^2 -Test Granulopoese, 24 Std., Versuch II

24 St. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	128	20	76,2957
PM	269	380	21,8926
My	522	600	7,5712
PMo	481	240	74,6209
MM	258	156	22,6359
Stab	100	52	14,0038
Seg	36	24	2,1149
Mo	52	328	207,5683

$n_1=1846$ $n_1=1800$ $\chi^2_{\tau}=426,7033$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

24 Std. Fluocortolonhemisulfat

MB	128	15	82,9719
PM	269	389	29,5943
My	522	593	9,7022
PMo	481	191	108,7419
MM	258	104	56,8025
Stab	100	30	33,7457
Seg	36	18	5,0076
Mo	52	400	289,2551

$n_1=1846$ $n_2=1740$ $\chi^2_{\tau}=615,8212$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

Tab. 7b: χ^2 -Test Granulopoese, 48 Std., Versuch II

48 Std. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	50	5	47,0454
PM	177	118	27,0625
My	397	406	6,5742
PMo	405	154	171,0179
MM	250	70	142,5513
Stab	21	14	3,2386
Seg	14	2	11,8373
Mo	200	1086	448,8517

$n_1=1514$ $n_2=1855$ $\chi^2_{\tau} = 858,1789$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

48 Std. Fluocortolonehemisulfat

MB	50	8	39,2076
PM	177	70	68,8939
My	397	347	19,1684
PMo	405	104	240,2165
MM	250	94	103,5588
Stab	21	24	0,0325
Seg	14	10	1,6522
Mo	200	1200	545,8233

$n_1=1514$ $n_2=1823$ $\chi^2_{\tau} = 1018,5532$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

Tab. 7c: χ^2 -Test Granulopoese, 72 Std., Versuch II

72 Std. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	27	-	30,4742
PM	150	125	6,0806
My	349	178	77,1805
PMo	380	112	179,0703
MM	120	80	13,3160
Stab	36	15	11,3198
Seg	18	-	20,4411
Mo	444	1200	267,0355

$$n1=1524 \quad n2=1710 \quad \chi^2_{\downarrow} = 604,9180$$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

72 Std. Fluocortolonhemisulfat

MB	27	-	30,3248
PM	150	80	29,3325
My	349	108	153,9403
PMo	380	80	228,9310
MM	120	40	49,0788
Stab	36	8	21,0477
Seg	18	16	0,4249
Mo	444	1360	375,3846

$$n1=1524 \quad n2=1692 \quad \chi^2_{\downarrow} = 888,3646$$

$P < 0,001$ (hoch signifikant)

Tab. 8a: χ^2 -Test Granulopoese, 24 Std., Versuch IV

24 Std. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	390	360	1,7594
PM	294	320	0,7065
My	81	112	4,4744
PMo	126	96	4,5785
MM	18	28	2,0117
Stab	12	16	0,5081
Seg	8	9	0,0440
Mo	12	16	0,5081

n1=941 n2=957 $\chi^2 = 14,5907$

P > 0,05 (nicht signifikant)

24 Std. Fluocortolonhemisulfat

MB	390	424	0,1806
PM	294	356	0,9788
My	81	114	2,4809
PMo	126	84	13,8845
MM	18	28	1,1956
Stab	12	23	2,5367
Seg	8	17	2,3159
Mo	12	8	1,3249

n1=941 n2=1054 $\chi^2 = 24,6959$

P < 0,01 (signifikant)

Tab. 8b: χ^2 -Test Granulopoese, 48 Std., Versuch IV

48 Std. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	320	220	14,8251
PM	266	380	24,8310
My	147	133	0,2598
PMo	100	68	4,9113
MM	52	80	7,0872
Stab	44	28	2,9616
Seg	25	12	4,0821
Mo	37	32	0,1942

$n_1=991$ $n_2=953$ $\chi^2 = 59,1523$

$P < 0,01$ (signifikant)

48 Std. Fluocortolonhemisulfat

MB	320	319	0,0647
PM	266	390	21,3830
My	147	95	12,0824
PMo	100	79	2,8354
MM	52	61	0,5722
Stab	44	31	2,4812
Seg	25	19	0,9238
Mo	37	14	10,7735

$n_1=991$ $n_2=1008$ $\chi^2 = 51,1162$

$P < 0,01$ (signifikant)

Tab. 8c: χ^2 -Test Granulopoese, 72 Std., Versuch IV

72 Std. Prednisolonacetat

Zelltyp	Kontr.	Zusatz	$(B - E)^2/E$
MB	266	180	2,6752
PM	376	360	6,6159
My	169	176	6,4893
PMo	96	48	6,9028
MM	60	32	3,3181
Stab	28	8	7,0558
Seg	28	8	7,0558
Mo	12	8	0,1455

$$n1=1035 \quad n2=820 \quad \chi^2_{\frac{1}{2}} = 40,2584$$

$P < 0,01$ (signifikant)

72 Std. Fluocortolonhemisulfat

MB	266	261	3,0658
PM	376	310	0,0795
My	169	130	0,6092
PMo	96	60	3,3176
MM	60	49	0,0262
Stab	28	17	1,1510
Seg	28	26	0,1276
Mo	12	19	3,0365

$$n1=1035 \quad n2=872 \quad \chi^2_{\frac{1}{2}} = 11,4134$$

$P > 0,1$ (nicht signifikant)

IV. Diskussion

Wir untersuchen in vier Versuchsreihen den in vitro-Einfluß von Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat auf menschliches leukämisches Knochenmark nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden. Mit der von uns verwendeten Konzentration von 0,25 µg/ml bewegen wir uns im therapeutisch erreichbaren Bereich des Blutspiegels (59).

Reifung und Regeneration der Knochenmarkzellen bestimmen die Proliferation des Knochenmarkes. Anhand der Reifungskurven und der G/E-Indices wird die Reifung ersichtlich; Mitoseindices und karyologische Kurven lassen eine Bewertung der Regeneration zu. Die Reifungskurven von vier akuten Myelosen zeigen in den Kontrollmedien eine fortschreitende Verminderung der Myeloblasten von durchschnittlich 54 % auf 19 % nach 72 Stunden. Während die Promyelozyten und die Myelozyten nach 24stündiger Bebrütungszeit leicht vermehrt werden, bleibt die Reifung zu den nicht mehr teilungsfähigen Vorstufen innerhalb der 72 Versuchsstunden erwartungsgemäß aus. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Beobachtungen von K e l l e r (37) und B o l l (8, 10).

Bei akuten Leukämien ist schon in den Kontrollkulturen der weiße Mitoseindex mit im Mittel 9 bis 5 %. (Tab. 4) gegenüber der normalen Granulopoese deutlich erniedrigt. Auch in vivo finden andere Autoren einen verminderten weißen Mitoseindex bei der akuten Leukämie (1, 3, 7, 15, 25, 27, 32, 36, 42, 49, 52, 55). Bedenkt man, daß die Mitosedauer gegenüber der normalen Granulopoese nach B o l l (8) und G a n s s e n (27) verlängert ist, ist eine weitere Abnahme der Regeneration unter Kulturbedingungen anzunehmen.

C l a r k s o n (18) und seine Mitarbeiter untersuchten mit zytokinetischen Methoden bei zwei Erwachsenen mit akuter Myeloblasten- bzw. Myelomonoblastenleukämie in vivo die Generationszeiten und die Mitoseindices der leukämischen Zellen.

Sie fanden eine verlängerte Generationszeit der Blasten und eine verminderte Produktionsrate. Der weiße Mitoseindex der Knochenmarkblasten war mit 0,66 % bzw. 0,52 % deutlich erniedrigt. Die oben genannten Autoren sehen deswegen ebenfalls die Ursache dafür, daß die leukämischen Blasten die Vorstufen der normalen Knochenmarkzellen verdrängen, darin, daß die Blasten weitgehend die Fähigkeit verloren haben, sich zu differenzieren. Viele gehen zugrunde, während andere als primitive Zellen bestehen bleiben und mit langer Generationszeit überleben, ohne zu reifen.

In der karyologischen Kurve der Granulopoese, die einen Mitosehäufungsgipfel bei den frühen Metaphasen aufweist, sehen wir eine Vermehrung der Prophasen und der frühen Metaphasen. Auch B o l l (10) und S c h u l z (55) fanden bei Leukämien vermehrt Pro- und frühe Metaphasen, was für eine Zunahme von offenen Endomitosen bei Leukämien spricht, also für eine weitere Verminderung der Mitosehäufigkeit.

Untersuchungen über das Proliferationsverhalten von Knochenmarkzellen nach Einwirkung von Corticosteroiden wurden bereits mehrfach durchgeführt (13,17,24,26,35,45,48,57,58), und auch anderen Zellkulturen wurden Corticoide zugesetzt (22,29,33,43,47,56 u.a.). Dabei fand sich meistens bei fast physiologischen Konzentrationen eine signifikante Proliferationshemmung in der Granulopoese und in der Erythropoese. Nur wenige Glucocorticoide förderten die Proliferation. Prednisolonacetat wurde nun hier als hemmendes, Fluocortolonhemisulfat als förderndes Glucocorticoid in ihrer Wirkung auf leukämische Blasten verglichen.

Nach Zusatz von Prednisolonacetat bzw. Fluocortolonhemisulfat zum Knochenmark akuter Myelosen finden wir hinsichtlich der Ausreifung der granulopoetischen Zellen signifikante Ergebnisse. Bei beiden Zusätzen stellt sich sowohl nach 24 als auch nach 48 und 72 Stunden eine signifikant verstärkte Ausreifung ein. Diese ist im Gegensatz zu den Ergebnissen an

normalem Knochenmark (17,59,34) durch beide Glucocorticoide gleichermaßen ausgeprägt. Prednisolonacetat verursacht bei der normalen Granulopoese eine Reifungshemmung, bei der leukämischen eine Reifungsförderung. Die Überprüfung der Mitoseindices ergab auch für beide Glucocorticoide keine signifikanten Abweichungen von den Kontrollkulturen.

In der Erythropoese zeichnet sich in unserer Versuchsreihe mit Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in den Versuchen 1 - 3 durch Zusatz von 0,25 µg/ml Prednisolonacetat zum Kulturmedium nach 48 Stunden eine signifikante Reifungsförderung ab, die sich bis 72 Stunden fortsetzt. An normalem Knochenmark wurde dagegen mit derselben Dosis Prednisolonacetat in drei von vier Fällen eine Reifungshemmung beschrieben (17,59).

Der Zusatz von 0,25 µg/ml Fluocortolonhemisulfat bewirkt beim Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in drei von vier Versuchen ebenfalls eine verstärkte Ausreifung, die aber in Versuch 1 und 2 erst nach 72 Stunden einsetzt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen mit Fluocortolonhemisulfat bei normalem Knochenmark, wobei ebenfalls eine Zunahme reifer Erythroblasten gefunden wurde (34).

Eine Regenerationsförderung der Erythroblasten, wie sie durch Fluocortolonhemisulfat im normalen Knochenmark beschrieben wird, konnten wir jedoch nicht feststellen. Die Mitoseindices der Erythroblasten sind ebenso wie nach Prednisolonacetatzusatz auch nach Fluocortolonhemisulfatzusatz erniedrigt (Tab. 2). Eine Signifikanz der Mitoseverminderung der Erythropoese durch die Zusätze ist aber nicht bewiesen (Tab. 3), da in zwei Fällen schon in der Kontrolle nur extrem wenige bzw. gar kein Mitosen bei den Erythroblasten gefunden werden.

Bei der Betrachtung der karyologischen Kurven finden wir in der Erythropoese sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den Kulturen mit Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat

einen mäßigen Häufungsgipfel bei den späten Metaphasen. Auffällig ist vor allem aber die Vermehrung von Pro- und frühen Metaphasen gegenüber normalen Knochenmarkkulturen.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß wir bei unseren erstmaligen in vitro-Untersuchungen über die Einwirkung von Fluocortolonhemisulfat und von Prednisolonacetat auf menschliches Knochenmark bei akuter Leukämie abweichende Ergebnisse von normalem Knochenmark erhielten. Bei gleicher Konzentration von 0,25 µg/ml fanden wir in den Kulturen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wirkung von Prednisolonacetat und Fluocortolonhemisulfat hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der leukämischen Granulopoese und Erythropoese. Sowohl der hemmende Effekt des Prednisolonacetats auf die Proliferation der normalen Granulopoese als auch der fördernde Einfluß des Fluocortolonhemisulfats auf die Regeneration entfallen hier. Die Mitosehäufigkeit bleibt nach den Mitoseindices und den karyologischen Kurven unbeeinflußt. Die signifikante Verschiebung der Granulopoese nach links kann ebenso als Reifungsförderung wie als direkt toxischer Effekt auf die leukämischen Blasten interpretiert werden. Durch eine Wiederholung der Versuche mit absoluter Zellzählung könnte diese Frage geklärt werden.

Das wichtigste Ergebnis unserer Versuche ist jedoch, daß das leukämische Knochenmark offensichtlich anders auf die direkte Einwirkung der untersuchten Glucocorticoide reagiert als normales Knochenmark.

V. Zusammenfassung

Es wird die Wirkung von Prednisolonacetat und Fluocortolon-hemisulfat in der Dosis von 0,25 µg/ml auf menschliches leukämisches Knochenmark von vier Patienten parallel untersucht. Dabei wird speziell der Frage nachgegangen, ob Fluocortolon-hemisulfat bezüglich Proliferationsaktivität und Ausreifung eine vom Prednisolonacetat differente Wirkung zeigt, da beide Corticoide auf die Proliferation nichtleukämischer Knochenmarkzellen unterschiedlich wirken.

Aus Differentialzählungen nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütungszeit werden Reifungs- und karyologische Kurven sowie Mitose- und G/E-Indices beider Zusatzkulturen mit den Kontrollkulturen in Beziehung gesetzt.

Es zeigt sich durch beide Glucocorticoid-Zusätze eine signifikante Ausreifungstendenz der granulopoetischen Zellen bis 72 Stunden, aber kein Effekt auf die Mitosehäufigkeit. Zwischen der Wirkung beider Zusätze konnten im Gegensatz zu normalem Knochenmark keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. Albrecht, M.: Atypische Mitosen bei akuter Leukämie. VIII. Kongr. d. Europ. Ges. f. Hämatol. Wien 1961 (Vortragsmanuskript).
2. Arbenz, U. and G. Keiser: Cytokinetic studies in a monocytic leukemia. 2nd Meeting europ. Study Group for Cell Proliferation (1968) (Vortragsmanuskript).
3. Astaldi, G.: Functional Cytology in Leukemia with Reference to Proliferating Activity. VIII. Kongr. Europ. Ges. Haematol. Wien 1961 (Vortragsmanuskript).
4. Begemann, H.: Klinische Hämatologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart 447 - 479 (1970).
5. Belitz, H. J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. In: Der Mathematikunterricht. Ernst Klett Verlag. Stuttgart. Heft 3, 83 (1960).
6. Boll, I.: Einführung in den Gesprächskreis "Proliferationskinetik der Leukämien". Sonderdruck aus: Leukämie. Editores R. Gross und J. Van de Loo Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York 161 - 164 (1972).
7. - Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag. Heidelberg 114 (1966).
8. - Corresponding experimental results with DNA-labeling and phase-contrast-observation to pathophysiology of acute leukemia. Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat. Lissabon II/1, 153 (1963).
9. - Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro-Granuloblastenmitosen. Folia haemat. 3, 58 (1958).
10. - Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulopoese. Folia hämat. 91, 172 (1969).
11. Boll, I., G. Mersch: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193 (1968).

12. Boll, I., G. Mersch: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro. Blut 19, 57 (1969).
13. Boll, I., G. Mersch, S. Schön, U. Göttke, D. Boxheimer, G. Lucke: Hormoneinwirkung auf die Proliferationskinetik humaner Knochenmarkkulturen. Klin. Wschr. 46:608 (1968).
14. Boll, I., I. Weissenfels, G. Koss, B. Herm: Die Proliferationskinetik der akuten Erwachsenenleukämien, untersucht an der Knochenmark-, Blut- und Phytohämagglutinininkultur. Aus: R. Gross, J. van de Loo, Leukämie. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 193-197 (1972).
15. Cardinali, G. and J. Blair: The Stathmokinetik Effect of Vincal leukoblastine on Normal Bone Marrow and Leukemic Cells. Cancer Res. 21, 1542 (1961).
16. Christoph, B.: Die Einwirkung von Triamcinolon auf menschliches Knochenmark in vitro (ausgewertet im Giemsa-Präparat und mit alkalischer Leukocytenphosphatase). Diss. Berlin 66 (1972).
17. Christoph, U.: Die Einwirkung von Prednisolonacetat auf menschliches Knochenmark (ausgewertet im Giemsa-Präparat und mit alkalischer Leukocytenphosphatase). Diss. Berlin 64 - 65 (1972).
18. Clarkson, B., T. Ohkita, K. Ota, and J. Fried: Studies of cellular proliferation in human leukemia. 1. Estimation of growth rate of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine. J. clin. Invest. 46:506 (1967).
19. Craddock, C.G. and G.S. Nakai: Leukemic cell proliferation as determined by in vivo DNA-synthesis. J. clin. Invest. 41:360 (1962).
20. Cronkite, E.P.: Kinetics of leukemic cell proliferation: In: Perspectives in leukemia. Grune & Stratton, New York 158 (1968).
21. Cronkite, E.P., P.C. Vincent: Granulocytopoiesis. In: Stohlmann, F., Jr.: Hemopoietic cellular proliferation. New York: Grune & Stratton
22. Darzynkiewicz, Z., M. Pienkowsky: Effect of Prednisolone on RNA-synthesis in human lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. Exp. Cell Res. 54:289 (1969).

23. Elsässer, H.: Die Regeneration der Granulopoese bei unreifzelliger Leukose in vitro. Diss. Berlin 55 - 57 (1971).
24. Farnes, P., B.E. Barker: Effect of Prednisolone on human bone marrow cultures. *Metabolism* 14:1 (1965).
25. Fieschi, A., E. Bianchini, G. Cambiaggi, C. Sacchetti, and E. Salvidio: Studies on the Biological Behavior of the Cell of Acute Leukemia. *Acta haemat.* 16, 126 (1956).
26. Fleischer, J.: Die Wirkung längerer Gaben von Prednisolon und Endoxan auf das Knochenmark des Kaninchens. *Folia haemat., N.F.*, 7:323 (1963).
27. Ganssen, O.: Mitosephasenablauf im Sternalmark akuter Leukämien. Eine vergleichende Untersuchung zur normalen Granulopoese. Diss. Berlin 23 - 27 (1961).
28. Geigy Documenta: Wissenschaftliche Tabellen. J.R. Geigy, Basel 157-169, 1968.
29. Heckmann, U.: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewe bekultur. *Med. Welt, N.F.*, 18:483 (1967).
30. Heilmeyer, L.: Hdb. d. Ges. Haematol. Bd. II, 2. Halbbd. 332 München: Urban & Schwarzenberg 1960.
31. Heilmeyer, L. und A. Hittmair: Hdb. d. Ges. Haematol. Bd. I. München: Urban & Schwarzenberg.
32. Heilmeyer, L.: Funktionsprüfung der Leukopoese des Knochenmarks. *Dtsch. med. Wschr.* 82, 644 (1957).
33. Heimann, D.H.: Combined action of adrenal cortical hormones and endotoxin on cells of the RES. *Int. Arch. Allergy* 35:591 (1969).
34. Heines, W.: Die Einwirkung von Dexamethasonhemisulfat im Vergleich mit Fluocortolonhemisulfat auf menschliches Knochenmark in vitro. Diss. Berlin in Vorbereitung.
35. Hunstein, W., M. Strey: Zur Wirkung von Prednisolon auf die H³-Thymidin-Einbaureate in Knochenmarkzellen von Ratten. *Klin. Wschr.* 43:52 (1965).
36. Introzzi, P.: Die haematologischen Arbeiten des Adolfo Ferratas. *Sci. Med. Ital.*, 7, 77 (1958).
37. Keller, K.: Reifungsphänomene der Granulopoese akuter Leukämien in vitro. Diss. Berlin 39 (1968).

38. Killmann, S.A.: Akute leukemia: The kinetics of leukemic blast cells in man. Ser. Haematol. I, 38, 103 (1968).
39. Killmann, S.A., E.P. Cronkite, J. Robertson, T.M. Fliedner and V.P. Bond: Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labeling in human beings in vivo with tritiated thymidine. Lab. Invest. 12:671 (1963).
40. Koch, H.M.: Die Einwirkung von Fluocortolon auf menschliches Knochenmark in vitro. Diss. Berlin 83 (1975).
41. Loten J. and L. Sachs: Induction of specific changes in the surface membrane of myeloid leukemic cells by steroid hormones. Dept. Genet. Weizmann Inst. Sci. Rehovoth - Int. J. Cancer 15/5, 731-740 (1975).
42. Mauri, C.: Attività proliferativa e sintesi dell'ADN nelle cellule leucemiche. Gazzetta Sanitaria 7/8, 397 (1961).
43. Meissner, J., H.G. Hansen, U. Wulff: Zum Wirkungsmechanismus des Cortisons auf den Nukleinsäurestoffwechsel. 2. Jahrestagg. Ges. f. Nukl. Med. Heidelberg (1964), S. 1377.
44. Morrison, J.H., J.R. Toepfer: Cellular changes in the bone marrow following chronic treatment of rats with cortisol. Acta haemat. 38, 250 (1967).
45. Müller, D.: Die Wirkung von Prednisolon auf das gesunde menschliche Knochenmark und auf Leukämiezellen. Proc., 10th Congr. europ. Soc. Haemat., Strasbourg II, 886-890 (1965).
46. Nordenson, N.G.: Studies on Bone Marrow from Sternal Puncture. Gener. Lithog. Ans. Stockholm 120-123 (1935).
47. Nowell, P.C.: Inhibition of leukocyte mitosis by Prednisolone in vitro. Cancer Res. 21:1518 (1961).
48. Reisner, E.H. jr., R. Odom: Effects of different hormones on blood cells differentiation in bone marrow in vitro. Excerpta med. 16:812 (1962).
49. Rohr, K.: Das menschliche Knochenmark. Georg Thieme Verlag Stuttgart 45-56 (1960).

50. Rondanelli, E.G., G. Pilla, F. Falchi, G.M. Barigazzi: Chronology of the mitotic cycle of acute leukemia cells. *Acta haemat. (Basel)* 42, 76 (1969).
51. Rondanelli, E.G., E. Magliulo, A. Giraldi, F.P. Carco: The chronology of the mitotic cycle of human granulocytopoiesis cells. Phase contrast studies on living cells in Vitro. *Blood* XXX, 557 (1967).
52. Sacchetti, C. u. E. Bianchini: Activités biologiques de la moelle osseuse dans les leucémies aiguës non traitées. Prolifération des cellules leucémiques. *Sang* 25, 499 (1954).
53. Saunders, E.F., B.C. Lampkin, and A.M. Mauer: Variation of proliferative activity in leukemic cell populations of patients with acute leukemia. *J. clin. Invest.* 46:1356 (1967).
54. Schellack, A.: Die Einwirkung von Prednisolonsulfat auf menschliches Knochenmark in vitro. Diss. Berlin, in Vorbereitung.
55. Schulz, R.D.: Mitose-Index und Mitose-Phasenverteilung im Knochenmark bei akuter Leukaemie. Diss. Berlin 66 (1961).
56. Taifour, A.-H.: Autoradiographische Untersuchungen an Glucocorticoid-vorbehandelten Mäusefibroblastenkulturen. Diss. Mannheim 44 (1968).
57. Thomas, K., E. Seidler: Knochenmark in vitro unter dem Einfluß cytostatischer und hormoneller Substanzen. *Folia haemat., N.F.*, 4:2 (1960).
58. Tormey, P.C., H.H. Fudenberg, R.M. Kamin: Effect of prednisolone on synthesis of DNA and RNA by human lymphocytes in vitro. *Nature* 13:281 (1967).
59. Weissenfels, J., J. Boll: Einwirkung von Corticosteroiden (Prednisolonacetat und Triamcinolon) auf menschliches Knochenmark in vitro. *Klin. Wschr.* 51, 907-1914 (1973).
60. Wilde, G.: Einwirkung von Dexamethasonsulfat auf menschliches Knochenmark in vitro. Diss. Berlin 51-52 (1974).

61. Wilmanns, W.: Wirkungsmechanismus und Angriffspunkte der Corticoide in der Leukämiebehandlung. Hämatol. u. Bluttransf. (Sonderbd. zu Blut) 8, 71 (1969).
62. Wintrobe, M.M., G.E. Cartwright, J.G. Palmer, W.J. Kuhns and L.T. Samuels: Effect of corticotrophin and cortisone on the blood in various-disorders in man. Arch. Int. Med. 88, 310 (1951).

Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. Belitz danke ich für die Hilfe bei der Signifikanzberechnung.

Der Firma Schering AG gilt mein Dank für die Herstellung der Corticoidlösungen.

Lebenslauf

Am 6. Juni 1944 wurde ich als drittes Kind des kaufmännischen Angestellten Paul Lüllwitz und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Schleifenbaum in Pyritz/Pommern geboren.

Nach der Vertreibung aus der Heimat wurde meine Familie in Würzburg ansässig. Dort besuchte ich von 1950 bis 1954 die Volksschule und von 1954 bis 1962 die Oberrealschule. Ich wechselte dann die Schule und bestand im Sommer 1965 das Abitur an der Oberrealschule in Bad Windsheim/Mfr.

Von Oktober 1965 bis September 1967 leistete ich einen zweijährigen Wehrdienst und beendete meine Dienstzeit als Leutnant der Reserve.

Im Oktober 1967 nahm ich das Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin auf. Ich bestand im Sommer 1970 die zahnärztliche Vorprüfung und am 11. Juni 1974 das Staatsexamen. Zum Sommersemester 1971 immatrikulierte ich mich zusätzlich im Fach Medizin. Im Sommer 1972 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und am 20. Februar 1976 das Staatsexamen.

Seit Mai 1976 bin ich als Zahnarzt in einer Berliner Praxis tätig.

Ab Januar 1977 werde ich mein Pflichtjahr als Medizinalassistent ableisten.

